Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage:.https://ijasr.um.ac.ir /

Research Paper
Vol. 14, No. 1, Spring 2022, p. 55-64

Effect of pentoxifylline antioxidant supplementation on improvement of sperm motility parameters in non-breeding season

Mahdi Nazari[1], Hossein Daghigh Kia[2]*, Abouzar Najafi[3]

Received: 19-01-2020
Revised: 09-06-2021
Accepted: 17-07-2021
Available Online: 07-06-2022

How to cite this article:
Nazari, M., H. Daghigh Kia, and A. Najafi. 2022. Effect of pentoxifylline antioxidant supplementation on improvement of sperm motility parameters in non-breeding season. Iranian Journal of Animal Science Research 14(1):55-64
DOI:10.22067/ijasr.2021.38267.0

Introduction: Despite extensive progress in reproductive techniques, sperm cryopreservation leads to reduction of motility and viability in comparison to fresh sperm. Scientists have studied different antioxidants to reduce the loss of viability, motility and DNA fragmentation, because this loss causes decrease in fertility. The biochemical changes which occurs during sperm cryopreservation affects the plasma membrane and as a result, sperm viability and fertility are affected after thawing. In ram sperm due to the high content of saturated high acid, cause high sensitivity to low temperatures and freezing. The process of fertilization introduces stress that greatly reduce its viability and fertility potential. Different antioxidants have been used to improve the quality of frozen semen which include methylxanthines such as pentoxifylline. Pentoxifylline can act as a protective against ROS, as well as protect and integrate cell membranes and is still used in freezing techniques and reduce the amount of lipid peroxidation. The purpose of this study was to compare the effect of adding different levels of pentoxifylline antioxidant to ram semen during nonbreeding season on membrane integrity, motility parameter and viability of freezing and thawing sperm.

Materials and Methods: In this study, semen was collected from 8 mature ram twice a week during spring season using an artificial vagina and the ejaculates were pooled in order to eliminate the individual effects of the rams. Tris lecithin–based extender was used in this study. After cooling, filling and sealing the samples, they were frozen with nitrogen vapor and immersed in liquid nitrogen and were stored until evaluation time. All steps were repeated in five replicates. For sperm evaluation, one month after freezing, the straws were extracted from liquid nitrogen and thawed in water bath at temperature of 37 °C for 30 s. Evaluation of sperm was performed for parameters containing CASA, abnormal morphology, malondialdehyde concentration.

Results and discussion: Despite the availability of advanced reproductive techniques, semen freezing is characterized by lower motility and viability compared to newly ejaculated sperm. Researchers try to prevent sperm motility and DNA damage and increase cell death under oxidative stress by using antioxidants, which can cause sperm loss. In physiological conditions, there is a balance between ROS production and semen's antioxidant capacity. Over-production of ROS disrupts the function of semen antioxidant enzymes and ultimately sperm function. It has been shown that in sperm, cAMP activates protein kinase (PKA), which regulates the phosphorylation of tyrosine protein, which is an important regulatory pathway in modulating events related to sperm capacity and that it makes the sperm acrosome healthy and preventing its hyperactivity. Pentoxifylline enhances cAMP levels by inhibiting phosphodiesterase enzyme, which increases ATP, cellular glycolysis, energy production, therefore increases sperm motility, and energy source (ATP) production.

Sperm motility is one of the main quality parameters of semen samples for artificial insemination. Pentoxifylline

1-Ph.D. student, Department of Animal Science. Faculty of Agriculture. University of Tabriz. Tabriz, Iran.
2-Professor, Department of Animal Science. Faculty of Agriculture. University of Tabriz. Tabriz, Iran.
3-Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran.
*Corresponding Author: daghighkia@tabrizu.ac.ir

can act as a protector against ROS, it also protects and integrates cell membrane and is also used in sperm freezing. Addition of pentoxifylline to sperm increases creatine kinase protein activity, which may modulate the ability to use pentoxifylline to increase sperm motility. The researchers reported that this antioxidant could have a positive effect on sperm motility. Pentoxifylline and caffeine have increased sperm motility and viability of frozen sperm in different mammalian species. The results of the data analysis indicate that adding all levels of antioxidants to semen in the non-breeding season increases the progressive sperm motility, but this increase in treatments receiving 1.5 and 3 µM levels were significant compared to the control group. ($P < 0.05$). The highest amount of motility parameters belonged to the 3 µM treatment. Addition of 1.5 and 3 µM of antioxidant Pentoxifylline significantly increased total motility compared to the control group ($P < 0.05$). Results showed that STR parameters significantly increased ($P < 0.05$) by adding 1.5 and 3 µM treatment. Although no significant differences were observed between control treatment and other experimental treatments for VAP, VCL, ALH, LIN, BCF, VSL parameters, by adding these treatments, these parameters were increased compared to control treatment.

Conclusion: In this study, various parameters such as sperm viability, morphology, sperm motility parameters and plasma membrane integrity, and level of malondialdehyde were evaluated during non-reproductive season. The results of this study showed that use of 3 µM pentoxifylline in the extender significantly improved the functional parameters of sperm after freezing-freezing in non-breeding season, while higher concentrations had less effect on the evaluated parameters.

Keywords: Antioxidant, Oxidative stress, Pentoxifylline

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

تأثیر افزودن پنتوکسی‌فیلین بر بهبود پارامترهای حرکتی اسپرم قوچ قزل در فصل غیرتولیدمثلی

مهدی نظری[1]، حسین دقیق کیا[2]*، ابوذر نجفی[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۲۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۳/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۶

نظری، م.، ح. دقیق کیا، و ا. نجفی. ۱۴۰۱. تأثیر افزودن پنتوکسی‌فیلین بر بهبود پارامترهای حرکتی اسپرم قوچ قزل در فصل غیرتولیدمثلی. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۴(۱): ۶۴-۵۵.

چکیده

در فرآیند انجماد-یخ‌گشایی اسپرم، تنش اکسیداتیو موجب کاهش تحرک، زنده‌مانی، عملکردهای غشایی و در نهایت باروری سلول‌های اسپرم می‌شود. هدف این مطالعه بررسی تأثیر پنتوکسی‌فیلین بعنوان آنتی‌اکسیدان، بر کیفیت پارامترهای حرکتی و زنده‌مانی اسپرم قوچ پس از یخ‌گشایی بود. در این پژوهش از ۸ رأس قوچ قزل با میانگین سن ۲ تا ۴ سال، دو بار در هفته با استفاده از مهبل مصنوعی اسپرم‌گیری شد. بمنظور از بین بردن اثرات فردی نمونه انزالها به نسبت مساوی باهم مخلوط شدند. سطوح مختلف پنتوکسی‌فیلین (۱/۵، ۳ و ۶ میکرومول) به رقیق‌کننده تهیه شده بر پایه لیسیتین-تریس افزوده شد. نمونه‌ها بعد از پر شدن در پایوت‌ها و طی مراحل سردسازی در بخار ازت منجمد شده و تا زمان ارزیابی در ازت مایع نگهداری شدند. افزودن ۱/۵ و ۳ میکرومول پنتوکسی‌فیلین موجب افزایش معنی‌دار تحرک کل و پیش‌رونده و همچنین افزایش حرکت خطی اسپرم و نیز زنده‌مانی نسبت به گروه شاهد شد ($P< ۰/۰۵$). افزودن ۱/۵ میکرومول پنتوکسی‌فیلین منجر به افزایش معنی‌دار یکپارچگی غشای پلاسمایی و کاهش اسپرم‌های با مورفولوژی ناسالم و کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه کنترل شد. بطورکلی افزودن ۱/۵ میکرومول پنتوکسی‌فیلین به رقیق‌کننده منی سبب بهبود بیشتر پارامترهای حرکتی، افزایش زنده‌مانی و کاهش اسپرم‌های با مورفولوژی ناسالم و کاهش سطح مالون دی‌آلدئید پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی شد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پنتوکسی‌فیلین، تنش اکسیداتیو.

مقدمه

امروزه بمنظور ذخیره‌سازی بلندمدت منی دام‌ها از فرآیند انجماد استفاده می‌شود. فناوری انجماد سلول امکان استفاده از فرآورده‌های بیولوژی را در زمان‌ها و مکان‌های مختلف فراهم کرده است. از طرفی حفظ عملکرد اسپرم پس از انجماد و یخ گشایی جهت باروری تخمک لازم است (Nazari *et al.*, 2021a). با وجود اینکه نگهداری اسپرم بصورت منجمد نگهداری طولانی‌مدت آن را ممکن می‌کند، ولی روند انجماد سبب القاء تغییرات فراساختاری و بیوشیمیایی بر اسپرم شده و غشاء پلاسمایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد(Nazari and Daghighkia, 2021)؛ درنتیجه زنده‌مانی و باروری اسپرم بعد از ذوب تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Holt, 2000). اسپرم قوچ دارای مقادیر بالایی اسیدهای چرب غیراشباع، اشباع و مقدار کمی کلسترول فسفولیپید در غشا سیتوپلاسمی نسبت به سایر پستانداران است و این امر سبب حساسیت زیاد آن نسبت به کاهش دما و انجماد می‌شود (Domínguez *et al.*, 2008). فرآیند سردسازی و انجماد، تنش‌های

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir)

DOI:10.22067/IJASR.2021.38267.0

فیزیکی و شیمیایی به غشای اسپرم وارد می‌کند که به ترتیب: زنده‌مانی و توانایی باروری آن را کاهش می‌دهد. تنش سرمایی وارده به اسپرم در طول فرآیند سردسازی با تنش اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد ارتباط دارد (Thuwanut *et al.*, 2011). رادیکال‌های آزاد بوسیله آزادسازی الکترون‌های اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها باعث آسیب‌های برگشت‌ناپذیر به سلول می‌شوند (Wang *et al.*, 1997). رادیکال‌های آزاد بیشتر بوسیله سیستم آنتی‌اکسیدانی حذف می‌شوند (S *et al.*, 2017). آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد دارند. در صورت آسیب یا از بین رفتن این سیستم، پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم منجر به آسیب‌های ساختاری و عملکردی به سلول می‌شود (Baumber *et al.*, 2000). در بسیاری از تحقیقات، از مواد مختلفی برای بهبود کیفیت منی منجمد استفاده شده است. رایج‌ترین محرک‌های حرکتی شامل متیل‌گزانتین‌ها مانند کافئین و پنتوکسی‌فیلین می‌باشند که مهارکننده‌های رقابتی و غیرانتخابی هستند. اثر فسفودی‌استراز آدنوزین مونوفسفات حلقوی باعث افزایش غلظت cAMP داخل سلولی و تقویت فسفوریلاسیون تیروزین در ناحیه دم اسپرم می‌شود (Brie et al., 2016). پنتوکسی‌فیلین می‌تواند بعنوان محافظت‌کننده در برابر ROS عمل کند، همچنین باعث محافظت و یکپارچگی غشاء سلول شده (Stephens *et al.*, 2013) و میزان لیپید پراکسیداسیون را کاهش دهد (Sancler-Silva *et al.*, 2018). بعلاوه در تولیدمثل برای افزایش تحرک اسپرم استفاده می‌شود. پنتوکسی فیلین در فناوری تولیدمثلی در انسان استفاده می‌شود (Guasti *et al.*, 2017) و میزان لقاح را افزایش می‌دهد (Kovačič *et al.*, 2006). افزودن پنتوکسی‌فیلین به اسپرم انسان باعث افزایش کراتین‌کیناز[1] می‌شود که این امر ممکن است باعث افزایش تحرک اسپرم شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان پنتوکسی‌فیلین به منی قوچ قزل در خارج از فصل تولیدمثلی بر روی ویژگی‌های حرکتی و سلامت غشاء اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه منی در ایستگاه خلعت پوشان دانشگاه تبریز انجام گرفت. جمع‌آوری منی از هشت رأس قوچ قزل با میانگین سن ۲ تا ۴ سال و در شرایط تغذیه‌ای و محیطی یکسان، با استفاده از مهبل مصنوعی و دو بار در هفته و در فصل بهار انجام گرفت. نمونه‌های منی هر یک از قوچها از نظر حجم، رنگ، تحرک، عدم آلودگی به ادرار و خون و میزان اسپرم با مورفولوژی طبیعی بررسی و سپس نمونه‌های منی با رنگ کرمی، تحرک بیشتر از ۷۰ درصد و کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیرطبیعی بعنوان منی نرمال در نظر گرفته شدند؛ در غیر این صورت، نمونه حذف گردید. برای از بین بردن اثرات فردی و احتمالاً اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های نرمال در مقادیر مساوی از هر قوچ باهم مخلوط شدند. در این تحقیق از رقیق‌کننده تریس به نسبت ۱:۲۰ به منی استفاده شده (تریس ۲۷/۱ گرم در لیتر، اسیدسیتریک ۱۴ گرم در لیتر، گلوکز ۱۰ گرم در لیتر) و ۷ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین بعنوان محافظت‌کننده سرمایی اضافه شدند. سپس به ۴ لوله آزمایشگاه به هرکدام ۲ سی‌سی بافر اضافه شد. سپس به ۳ لوله سطوح ۱/۵، ۳ و ۶ میکرومولار آنتی‌اکسیدانی اضافه شده و به یک لوله آنتی‌اکسیدانی اضافه نشد (تیمار شاهد). سپس اسپرم به نسبت۱:۲۰ به هرکدام از لوله‌ها اضافه شده و در مرحله بعد لوله‌ها به یخچال در دمای ۴°C منتقل و پس از دو ساعت سردسازی و تعادل، نمونه‌های منی در پایوت ۰/۲۵ میلی لیتری پر شدند.

انجماد و یخ‌گشایی

پایوتها بمدت ۷ دقیقه به فاصله ۴ سانتی‌متر از سطح نیتروژن مایع قرار گرفته و سپس در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. پایوت ها بعد از انجماد تا زمان ارزیابی در ازت مایع (۱۹۶ °C−) نگهداری شدند. تمامی مراحل در پنج مرحله تکرار شدند. یک ماه پس از انجماد، پایوت‌ها را برای یخ‌گشایی از ازت مایع خارج نموده و در داخل بن ماری با دمای ۳۷°C بمدت ۳۰ ثانیه ذوب شوند. سپس پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، مورفولوژی اسپرم‌ها و غلظت مالون‌دی آلدئید مورد ارزیابی قرار گرفتند (Daghigh Kia *et al.*, 2021).

تحرک اسپرم

پس از یخ‌گشایی نمونه‌ها در دمای ۳۷ °C، به نسبت ۱:۱۰ رقیق سازی شد (۱۰^۶×۲۰− ۱۰ اسپرم در هر میلی) و مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه را روی لام (Leja, Nieuw-Vannep, Netherlands) از قبل گرم شده قرار داده، و روی صفحه میکروسکوپ (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) گذاشته و با استفاده از سیستم کامپیوتری ارزیابی اسپرم (CASA, Video Test Sperm 3.1 Russia) در حداقل ۵ زمینه، پارامترهای تحرک کل[2]، تحرک پیش‌رونده[3]، و ویژگی‌های کینتیکی حداقل ۲۰۰ اسپرم ارزیابی شدند (Najafi *et al.*, 2017).

زنده‌مانی (رنگ‌آمیزی ائوزین و نیگروزین)

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده از رنگ‌آمیزی ائوزین نیگروزین استفاده شد. بدین منظور پس از یخ‌گشایی نمونه‌ها، ۱۰µL نمونه اسپرم رقیق‌شده از هر گروه بر روی یک لام قرارگرفته و با20 µL از رنگ

1- Creatine kinase
2- Total Motility
3- Progressive Motility

ائوزین نیگروزین مخلوط گردید. سپس توسط یک لام دیگر نمونه رنگ‌شده بر روی لام گسترش‌یافته و پس از خشک شدن، توسط میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی × ۴۰ و شمارش 200 اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده (رنگ نشده) و مرده (رنگ‌شده) تعیین شدند.

ارزیابی مورفولوژی اسپرم

15میکرولیتر از هر نمونه منی را به میکروتیوب‌های حاوی μL ۱۵۰ از محلول هانکوک افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C داخل بن ماری نگهداری شد سپس یک قطره از این مخلوط را روی لام قرار داده و توسط یک لامل پوشانده و با شمارش حداقل200 اسپرم زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ×۴۰، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شدند (Nazari *et al.*, 2021c).

سلامت غشاء پلاسمایی اسپرم[1]

برای ارزیابی سلامت غشا اسپرم از آزمون هاست استفاده شد. برای این منظور ۱۰ μL از مایع منی به ۱۰۰ μL محیط هایپواسموتیک هاست (۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات سدیم، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول) اضافه گردید. با توجه به اینکه فشار اسمزی مورد نیاز برای اسپرم قوچ ۳۷۵-۳۲۵ میلی اسمول بر کیلوگرم بوده و میزان فعالیت اسمزی محلول هاست ۱۰۰ میلی اسمول در کیلوگرم است، بنابراین قرار گرفتن در محیطی با فشار اسمزی پایین‌تر (هایپو اسمول) می‌تواند باعث تمایز اسپرم‌های با غشای سالم از اسپرم‌هایی با غشای آسیب‌دیده گردد. بدین‌صورت که دم اسپرم‌های سالم پس از مواجهه با این محیط متورم شده و به شکل پیچ‌خورده درمی‌آید. بمنظور انجام این آزمایش، ۱۰ μL از نمونه اسپرم ذوب شده با ۱۰۰μL از محلول هایپواسمول فوق درون یک میکروتیوب مخلوط شده و بمدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. سپس ۵ μL از محلول فوق بر روی یک لام قرارگرفته و درصد اسپرم-های با دم متورم و پیچ‌خورده با شمارش 200 اسپرم و بزرگنمایی ×۴۰ با میکروسکوپ فازکنتراست تعیین گردید.

مالون‌دی آلدئید

بمنظور تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم از آزمودن TBARsاستفاده شد. در این آزمودن، میزان مالون دی آلدئید بعنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپیدها از طریق واکنش با تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ابتدا بمنظور رسوب پروتئین‌ها، ۱ میلی‌لیتر از محلول هر گروه تیماری بعد از ذوب در دمای ۳۷ °C با ۲ میلی‌لیتر اسیدتری کلرواستیک در یک لوله استریل مخلوط شده و سپس جهت جلوگیری از وقوع پراکسیداسیون لیپیدی در طی زمان انجام آزمایش، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول هیدروکسی تولوئن بوتیله شده یا (BHT دو درصد در اتانول) به همراه ۱ میلی‌لیتر EDTA به محلول مورد نظر افزوده شد. سپس نمونه‌ها بمدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰×g سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، ۱ میلی‌لیتر از محلول بالایی را برداشته و با ۱ میلی‌لیتر از محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷ درصد در یک فالکون مخلوط کرده و بمدت ۲۰ دقیقه در آب °C ۹۵ قرار گرفتند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب نور نمونه‌ها در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد (Daghigh Kia and nazari, 2020; Nazari *et al.*, 2021b).

آنالیز آماری

این طرح دارای ۴ تیمار در ۵ تکرار بود. داده‌های بدست‌آمده برای پارامترهای درصد تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، پاسخ به محلول HOST، هانکوک و سطح مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از GLM نرم‌افزار SAS (9.3) در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی استفاده شد.

نتایج و بحث

علیرغم بکارگیری تکنیک‌های پیشرفته در انجماد منی، هنوز اسپرم‌های منجمدشده در مقایسه با اسپرم تازه انزال شده از تحرک و زنده‌مانی کمتری برخوردارند (Setyawan *et al.*, 2015). پژوهشگران تلاش می‌کنند تا با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها از کاهش تحرک اسپرم و کاهش آسیب به DNA و افزایش میزان مرگ سلولی در شرایط تنش اکسیداتیو جلوگیری کنند (Vattem and Shetty, 2003). در شرایط فیزیولوژیک یک تعادل بین تولیدROS و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی منی وجود داشته و تولید بیش از حدROS موجب به هم خوردن این تعادل و اختلال در عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی منی و در نهایت عملکرد اسپرم‌ها می‌شود (Baumber *et al.*, 2000). نشان داده‌شده است که در اسپرم، cAMP پروتئین کیناز (PKA) را فعال می‌کند که وظیفه تنظیم فسفوریلاسیون تیروزین را بر عهده دارد که یک مسیر تنظیمی مهم در تعدیل وقایع مرتبط با ظرفیت پذیری اسپرم است (Yovich, 1993)، این امر باعث می‌شود که آکروزوم اسپرم سالم مانده و از هایپراکتیو شدن آن جلوگیری شود. در مورد تأثیر پنتوکسی‌فیلین در اسپرم منجمدشده اختلاف نظر وجود دارد. بعضی از گزارش‌ها نشان داده‌اند که پنتوکسی‌فیلین تأثیر مفیدی در کاهش واکنش آکروزومی بعد از انجماد دارد. مکانیسم‌های تأثیر پنتوکسی فیلین بر وضعیت اسپرم را می‌توان در چند دسته: مهار فسفو دی استراز، افزایش تبدیل ATP به cAMP، تأثیر بر نقل و انتقال کلسیم داخل سلولی و از بین بردن رادیکال‌های آزاد ناشی از دژنراسیون و نکروز اسپرم‌ها خلاصه کرد (Yovich, 1993). پنتوکسی‌فیلین با مهار آنزیم فسفودی‌استراز سبب

1- HOST (Hypo-Osmotic Swelling Test)

افزایش سطح cAMP در داخل سلول می‌شود (Kim et al., 2016). این افزایش باعث افزایش ATP می‌شود که بدنبال آن، سبب گلیکولیز سلولی، تولید انرژی، افزایش تحرک اسپرم و افزایش تولید ATP می‌گردد (Park et al., 2000). همچنین محققان گزارش کردند که افزودن پنتوکسی‌فیلین به مایع منی باعث افزایش پارامترهای حرکتی اسپرم می‌شود (Gradil and Ball, 2000). محققین گزارش کردند که این دارو می‌تواند بر تحرک اسپرم تأثیر مثبتی داشته باشد. پنتوکسی فیلین و کافئین سبب افزایش میزان تحرک و طول عمر اسپرم در حالت تازه و منجمد در گونه‌های مختلف پستانداران شده است (Jenagrad et al., 2018).

جدول ۱-مقایسه ویژگی‌های تحرک اسپرم منجمد-یخگشایی شده قوچ قزل در بین سطوح مختلف آنتی اکسیدان پنتوکسی‌فیلین (میانگین ± انحراف معیار)

Table 1- Comparison of motility parameters of post thawed ram sperm among different levels of antioxidant pentoxifylline (Mean ± SEM)

Variable متغیر	Control کنترل	1.5 µM ۱/۵ میکرومولار	3 µM ۳ میکرومولار	6 µM ۶ میکرومولار	SEM	P value
حرکت پیشرونده Progressive Motility (%)	24.20[b]	28.00[a]	28.80[a]	26.20[ab]	0.897	0.0107
تحرک کل Total Motility (%)	45.40[b]	53.40[a]	53.20[ab]	50.04[ab]	1.58	0.0084
میانگین سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر بر ثانیه) average path velocity (µm.sec)	17.27	19.38	20.6	19.87	1.64	0.5378
سرعت اسپرم در خط مستقیم (میکرومتر بر ثانیه) straight linear velocity (µm.sec)	12.88	15.93	16.94	16.12	1.36	0.2041
سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده (میکرومتر بر ثانیه) curvilinear velocity (µm.sec)	50.26	54.66	54.69	53.97	3.17	0.7253
معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم(درصد) straightness (%)	74.49[b]	82.15[a]	82.49[a]	81.21[ab]	1.81	0.0204
معیار خطی بودن اسپرم (درصد) linearity (%)	26.07	28.76	29.63	30.35	2.06	0.5005
بیشترین دامنه حرکت جانبی(میکرومتر) amplitude of lateral head displacement (µm)	1.53	1.54	1.47	1.57	0.12	0.5816
فرکانس حرکت جانبی(هرتز) beat/cross frequency (Hz)	14.16	15.35	14.28	14.96	0.82	0.7049

[a,b] میانگین‌ها با حروف ناهمسان بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است ($P< ۰/۰۵$).

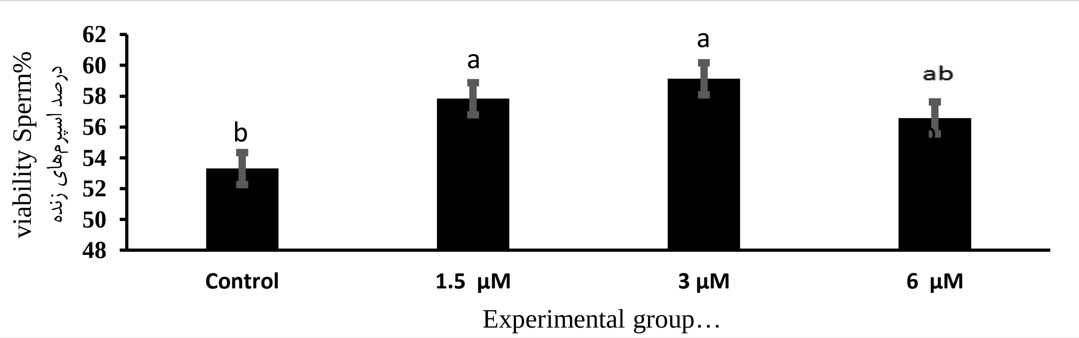
[a,b] Mean within same column with different superscripts differ ($P< 0.05$).

تأثیر افزودن سطوح مختلف مخلوط آنتی‌اکسیدان پنتوکسی‌فیلین بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم در جدول شماره یک نشان داده شده است. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که افزودن همه سطوح آنتی‌اکسیدان‌ها به منی قوچ در فصل غیرتولیدمثل باعث افزایش حرکت پیش‌رونده اسپرم‌ها می‌شود، اما این افزایش در تیمارهای دریافت کننده سطوح ۱/۵ و ۳ میکرومولار نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($P< ۰/۰۵$). بالاترین میزان پارامترهای حرکتی تقریباً متعلق به تیمار ۳ میکرومولار بود. افزودن ۱/۵ و ۳ میکرومولار آنتی اکسیدان پنتوکسی‌فیلین باعث افزایش معنی‌دار تحرک کل در مقایسه با تیمار کنترل شد ($P< ۰/۰۵$). بالاترین میزان، مربوط به تیمار سطح ۱/۵ میکرومولار بود. نتایج حاکی از آن است که پارامتر STR با افزودن تیمار ۱/۵ و ۳ میکرومولار بطور معنی‌داری افزایش یافت ($P< ۰/۰۵$). اگرچه تفاوت معنی‌داری در پارامترهای VAP,VCL, ALH و LIN،BCF، VSLبین تیمار کنترل و سایر تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد، ولی این پارامترها با افزودن تیمارها، نسبت به تیمار شاهد روند افزایشی نشان دادند، که همسو با گزارشی بود که در آن افزودن ۵ و ۱۰ میلی‌مولار پنتوکسی‌فیلین به منی سگ باعث افزایش تحرک پیش‌رونده اسپرم در هنگام ذوب شد (Lecewicz et al., 2019). همچنین در تحقیقی دیگر گزارش کردند که افزودن ۳/۵ تا ۷ میلی‌مولار از این آنتی‌اکسیدان، باعث افزایش تحرک پیش‌رونده اسپرم اسب شد (Stephens et al., 2013). پنتوکسی‌فیلین سبب بهبود وضعیت فیزیولوژیک اسپرم و همچنین افزایش میزان موفقیت در لقاح خارج رحمی (IVF) شد (Rizk et al., 1995). تحرک پیش‌رونده اسپرم وابسته به سطح ATP سلول است (Megory et al., 1987). تحرک اسپرم یکی از پارامترهای اصلی کیفیت نمونه‌های یخزده منی برای تلقیح مصنوعی است (Van den Berghe et al., 2018). پنتوکسی فیلین می‌تواند بعنوان محافظت‌کننده در برابر ROS عمل کرده، باعث محافظت و یکپارچگی غشاء سلول می‌شود (Yovich, 1993). این آنتی اکسیدان سبب کاهش میزان تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی می‌شود (Wong et al., 2002). افزودن

پنتوکسی‌فیلین به اسپرم انسانی فعالیت پروتئین کراتین کیناز را افزایش می‌دهد، این امر میزان تحرک اسپرم را افزایش می‌دهد (Banihani and Abu-Alhayjaa, 2016).

در این مطالعه افزودن سطوح ۱/۵ و ۳ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین در مایع منی باعث افزایش معنی‌دار حرکت پیش‌رونده و تحرک کل شد که با نتایج یک تحقیقی که در آن افزودن مهارکننده فسفودی استراز، کافئین و پنتوکسی‌فیلین، باعث افزایش پارامترهای تحرک در منی سگ شد، در توافق است (Lecewicz *et al.*, 2019). همچنین کنتولا و همکاران گزارش کردند که اضافه کردن پنتوکسی فیلین هم در نمونه‌های حاصل از مردان مبتلا به آستنواسپرمی و هم در نمونه‌های طبیعی می‌تواند باعث افزایش قابل ملاحظه میزان تحرک اسپرم شود (Centola *et al.*, 1995).

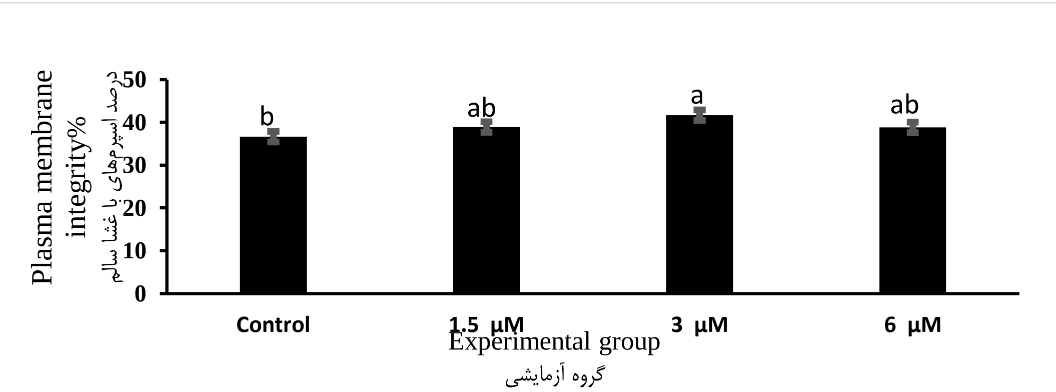
نتایج حاصل از آنالیزدادها نشان می‌دهند که تیمارهای ۱/۵ و ۳ میکرومولار بطور معنی‌داری باعث افزایش درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها پس از انجماد-یخ‌گشایی نسبت به گروه کنترل شد (P< ۰/۰۵) (شکل ۱). بالاترین میزان افزایش زنده‌مانی متعلق به گروه دریافت‌کننده تیمار ۳ میکرولیتربود. پنتوکسی فیلین بر نقل‌وانتقال داخل سلولی کلسیم تأثیر گذاشته و باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد ناشی از دژنراسیون و نکروز اسپرم می‌شود، این امر افزایش زنده‌مانی اسپرم تیمار شده با پنتوکسی فیلین را توجیه می‌کند (Yovich, 1993) که با نتایج ما همخوانی دارد.



شکل ۱- اثر استفاده از آنتی‌اکسیدان پنتوکسی‌فیلین بر زنده‌مانی اسپرم‌های پس از یخ‌گشایی

Figure 1- Effect of using antioxidant pentoxifylline on sperm Viability after thawing

بیشتر صدمات ناشی از انجماد اسپرم بر غشاء پلاسمایی آن وارد می شود (LUCIO *et al.*, 2016). نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها بیانگر آن اســـت که افزودن ۳ میکرومولار پنتوکســـی فیلین باعث افزایش معنی‌دار میزان یکپارچگی غشاء اسپرم‌های دریافت کننده تیمار نسبت به گروه کنترل می‌شود (P< ۰/۰۵) (شکل ۲).



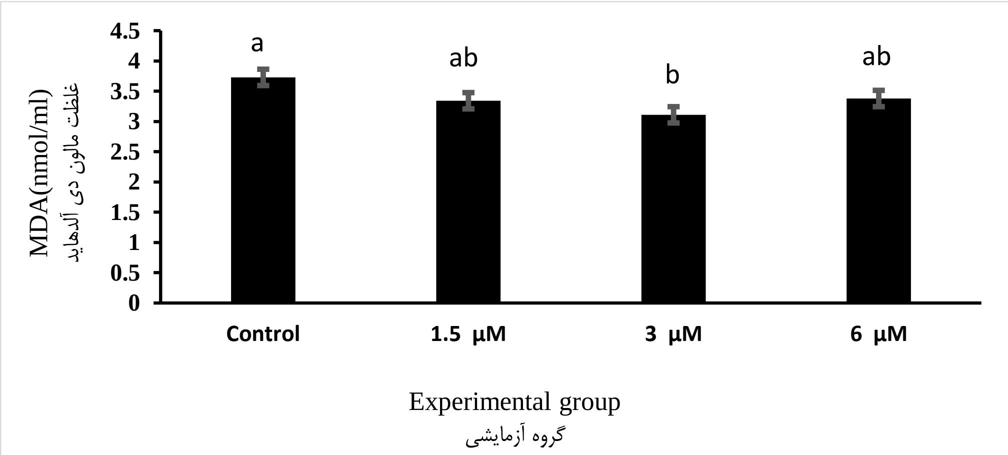
شکل ۲– اثر استفاده از آنتی‌اکسیدان پنتوکسی‌فیلین بر سلامت غشاء اسپرم‌های پس از یخ‌گشایی

Figure 2- Effect of using antioxidant pentoxifylline on plasma membrane integrity of sperm after thawing

تحقیقات نشان داده است که مالون‌دی‌آلدئید بعنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی، می‌تواند باعث تخریب کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها گردد (Zhang *et al.*, 2019). سطوح بالای ROS می‌تواند سبب آسیب DNA اسپرم شده و در نتیجه موجب کاهش زنده‌مانی

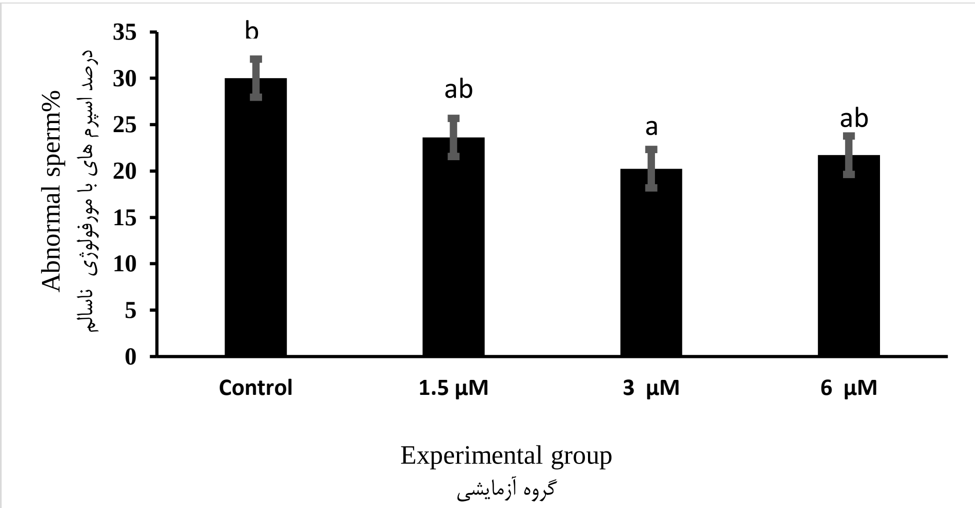
اسپرم شود (Sancler-Silva *et al.*, 2018)

پنتوکسی فیلین می‌تواند بعنوان محافظت‌کننده در برابر ROS عمل کند. محققین گزارش کردند که موش‌هایی که پنتوکسی‌فیلین به تنهایی و یا همراه با ملاتونین دریافت کردند، پراکسیداسیون لیپیدی بطور معنی‌داری کمتر از گروه دریافت کننده ملاتونین بود؛ همینطور گزارش کردند که پنتوکسی‌فیلین باعث تعدیل آنزیم‌های SOD و CAT می‌شود(Ranjbar and Baeeri, 2013). نتایج حاصل از تحقیق حاضر در شکل ۳ نشان می‌دهد افزودن ۳ میکرومولار به نمونه مایع منی قبل از انجماد باعث کاهش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدی در موقع ذوب نمونه‌ها می‌شود.



شکل ۳- اثر استفاده از آنتی‌اکسیدان پنتوکسی‌فیلین بر میزان مالون دی‌آلدئید موجود در پلاسمای منی پس از یخ‌گشایی

Figure3 -Effect of using antioxidant pentoxifylline on seminal plasma Malondialdehyde after thawing



شکل ٤- اثر استفاده از آنتی‌اکسیدان پنتوکسی‌فیلین بر میزان اسپرم‌های ناسالم پس از یخ‌گشایی

Figure 4- Effect of using antioxidant pentoxifylline on abnormal sperm after thawing

افزودن ۳ میکرومولار پنتوکسی فیلین باعث کاهش درصد اسپرم‌های ناسالم و همچنین کاهش معنی‌دار غلظت مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه کنترل شد ($P< ۰/۰۵$) (شکل ۴)، که این مغایر با گزارش (Lecewicz *et al.*,2019) است که نشان داد افزودن پنتوکسی‌فیلین بر اسپرم سگ تأثیر بسزایی در سلامت غشا اسپرم نداشت.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان دادند که استفاده از ۳ میکرومولار پنتوکسی فیلین در رقیق‌کننده سبب بهبود معنی‌دار پارامترهای عملکردی اسپرم-های قوچ قزل پس از انجماد-یخ‌گشایی در فصل غیرتولیدمثلی شد.

Refrences

1. Banihani, S. and R. Abu- Alhayjaa. 2016. The activity of seminal creatine kinase is increased in the presence of pentoxifylline. Andrologia, 48(5):603-4.
2. Baumber, J., B. A. Ball, C. G. GRAVANCE, V. Medina and M. C. DAVIES- MOREL. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. Journal of andrology, 21(6):895-902.
3. Brie, D., A. Sahebkar, P. E. Penson, M. Dinca, S. Ursoniu, M.-C. Serban, A. Zanchetti, G. Howard, A. Ahmed and W. S. Aronow. 2016. Effects of pentoxifylline on inflammatory markers and blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of hypertension, 34(12):2318-29.
4. Centola, G., R. Cartie and C. Cox. 1995. Differential responses of human sperm to varying concentrations of pentoxyfylline with demonstration of toxicity. Journal of andrology, 16(2):136-42.
5. Daghigh Kia, H. and M. Nazari. 2020. Effect of combination of MitoQ as a targeted antioxidant and Pentoxifylline as a non-targeted in Lake based extender on functional quality of rooster sperm during chilled storage on 4◦C. Journal of Animal Science Research, 30(3):71-83.
6. Daghigh Kia, H., M. Nazari and J. Emami. 2021. Effect of cysteamine amino acid supplementation on reduced lipid peroxidation rate of rooster sperm during freezing-thawing. Journal of Animal Science Research, 31(3):113-24. (In Persian).
7. Domínguez, M., A. Falcinelli, F. Hozbor, E. Sanchez, A. Cesari and R. Alberio. 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. Theriogenology, 69(5):564-73.
8. Gradil, C. and B. Ball. 2000. The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. Theriogenology, 54(7):1041-7.
9. Guasti, P., G. Monteiro, R. Maziero, M. Carmo, J. Dell'Aqua Jr, A. Crespilho, E. Rifai and F. Papa. 2017. Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. Animal reproduction science, 179:27-34.
10. Holt, W. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology, 53(1):47-58.
11. Jenagrad, P. A., H. D. Kia, G. Moghaddam and M. Ebrahimi. 2018. Evaluating caffeine antioxidant properties on Ghezel ram sperm quality after freeze-thawing. REVUE DE MEDECINE VETERINAIRE, 169(10-12):233-40.
12. Kim, H. K., S.-H. Hwang, S. O. Lee, S. H. Kim and S. Abdi. 2016. Pentoxifylline ameliorates mechanical hyperalgesia in a rat model of chemotherapy-induced neuropathic pain. Pain Physician, 19(4):E589-E600.
13. Kovačič, B., V. Vlaisavljević and M. Reljič. 2006. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. Journal of andrology, 27(1):45-52.
14. Lecewicz, M., R. Strzeżek, A. M. Majewska, P. S. Purpurowicz and W. Kordan. 2019. The effect of different concentrations of caffeine, pentoxifylline and 2'-deoxyadenosine on the biological properties of frozen-thawed canine semen. Annals of Animal Science, 1(ahead-of-print).
15. Lucia, C. D. F., D. D. S. R. Andrimani, M. M. Brito and C. I. Vannucchi. 2016. Oxidative Stress Challenges During The Sperm Cryopreservation in Dogs/Desafios del Estres Oxidativo Durante La Criopreservación Espermática en Perros. Journal of Veterinary Andrology, 2(1)
16. Megory, E., Z. Shoham, I. Madgar, B. Lunenfeld, M. Modan and R. Weissenberg. 1987. ATP content in human semen and sperm quality. Archives of andrology, 19(3):243-7.
17. Najafi, A., H. Daghigh-Kia, H. V. Dodaran, M. Mehdipour and M. Alvarez-Rodriguez. 2017. Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. Animal reproduction science, 177:35-41.
18. Nazari, M., H. Daghigh Kia, M. Ebrahimi, A. Najafi and M. Mehdipour. 2021a. Effect of 2, 4 dinitrophenol as a targeted antioxidant on Ghezel ram sperm on functional quality performance after freeze-thawing process of semen on non-breeding season. Animal Sciences Journal, 34(130):181-90. (In Persian).
19. Nazari, M., H. Daghigh Kia, A. Najafi, M. Mahdipour and J. Emami. 2021b. Effect of Different Levels of 2, 4 Dinitrophenol and Luteolin on Semen Quality of Rooster during Freezing-Thawing Process. Research on Animal Production, 12(34):109-17. (In Persian).
20. Nazari, M. and H. Daghighkia. 2021. Investigating the process of surviving sperm in oviduct to get a method for sperm storage without cryopreservation. Journal of Cell & Tissue, 12(4):260-72. (In Persian).

21. Nazari, M., H. Daghighkia and A. Najafi. 2021c. Study of different levels of Vitamin A supplementation in extender on sperm quality in cooling storing and cryopreservation condition in Ghezel ram. Journal of Cell & Tissue, 12(2):134-45.
22. Park, W. S., Y. S. Chang and M. Lee. 2000. The efficacy of pentoxifylline as an anti-inflammatory agent in experimental Escherichia coli meningitis in the newborn piglet. Neonatology, 77(4):236-42.
23. Ranjbar, A. and M. Baeeri. 2013. The effect of pentoxifylline on malathion-induced mitochondrial damage in rat liver. Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences, 15(4):83-92.
24. Rizk, B., S. Fountain, S. Avery, C. Palmer, M. Blayney, M. Macnamee, C. Mills and P. Brinsden. 1995. Successful use of pentoxifylline in male-factor infertility and previous failure of in vitro fertilization: a prospective randomized study. Journal of assisted reproduction and genetics, 12(10):710-4.
25. S, S., G. M, R. J, H. D, H. J and Z. N. 2017. Evaluation the effects of different levels of vitamin E and Nano Selenium on sperm quality parameters of Leghorn rooster during chilled storage on 4◦C. Journal of Animal Science Researches, 26(4):59-70.
26. Sancler-Silva, Y., B. Ball, A. Esteller-Vico, E. Silva-Júnior, C. Freitas-Dell'aqua and F. Papa. 2018. Sperm quality of stallions treated with pentoxifylline after scrotal heat stress. Journal of Equine Veterinary Science, 66:87.
27. Setyawan, E. M. N., M. J. Kim, H. J. Oh, G. A. Kim, Y. K. Jo, S. H. Lee, Y. B. Choi and B. C. Lee. 2015. Maintaining canine sperm function and osmolyte content with multistep freezing protocol and different cryoprotective agents. Cryobiology, 71(2):344-9.
28. Stephens, T. D., R. M. Brooks, J. L. Carrington, L. Cheng, A. C. Carrington, C. A. Porr and R. K. Splan. 2013. Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen. Journal of equine veterinary science, 33(8):615-21.
29. Thuwanut, P., K. Chatdarong, A.-S. Bergqvist, L. Söderquist, K. Thiangtum, D. Tongthainan and E. Axnér. 2011. The effects of antioxidants on semen traits and in vitro fertilizing ability of sperm from the flat-headed cat (Prionailurus planiceps). Theriogenology, 76(1):115-25.
30. Van den Berghe, F., M. C. J. Paris, M. B. Briggs, W. K. Farstad and D. B. B. P. Paris. 2018. A two-step dilution tris-egg yolk extender containing Equex STM significantly improves sperm cryopreservation in the African wild dog (Lycaon pictus). Cryobiology, 80:18-25.
31. Vattem, D. A. and K. Shetty. 2003. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (Vaccinium macrocarpon) mediated by Lentinus edodes using a solid-state system. Process Biochemistry, 39(3):367-79.
32. Wang, Y., R. Sharma and A. Agarwal. 1997. Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. Urology, 50(3):409-13.
33. Wong, W. Y., H. M. Merkus, C. M. Thomas, R. Menkveld, G. A. Zielhuis and R. P. Steegers-Theunissen. 2002. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Fertility and sterility, 77(3):491-8.
34. Yovich, J. L. 1993. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. Human reproduction, 8(11):1786-91.
35. Zhang, J., X. Bao, M. Zhang, Z. Zhu, L. Zhou, Q. Chen, Q. Zhang and B. Ma. 2019. MitoQ ameliorates testis injury from oxidative attack by repairing mitochondria and promoting the Keap1-Nrf2 pathway. Toxicology and applied pharmacology, 370:78-92.